

DOCKET NO.: 279585US0XPCT

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Katsuya OKUMURA, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HEREWITH

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP04/05878

INTERNATIONAL FILING DATE: April 23, 2004

FOR: BIOCHIP AND BIOCHIP KIT, AND METHOD OF PRODUCING THE SAME AND
METHOD OF USING THE SAME**REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION**Commissioner for Patents
Alexandria, Virginia 22313

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that
the applicant claims as priority:

| <u>COUNTRY</u> | <u>APPLICATION NO</u> | <u>DAY/MONTH/YEAR</u> |
|----------------|-----------------------|-----------------------|
| Japan | 2003-122514 | 25 April 2003 |
| Japan | 2003-363623 | 23 October 2003 |

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to the International Bureau in PCT Application No. PCT/JP04/05878. Receipt of the certified copy(s) by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

Customer Number

22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 08/03)

23. 4. 2004

日本特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

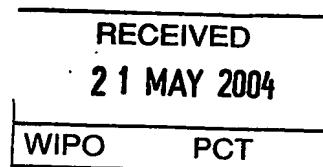
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2003年 4月 25日

出願番号
Application Number: 特願 2003-122514
[ST. 10/C]: [JP 2003-122514]

出願人
Applicant(s): J S R 株式会社
株式会社オクテック

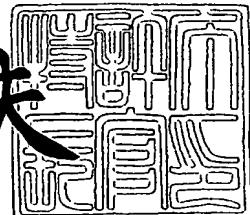


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 4月 5日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 J010-10438

【提出日】 平成15年 4月25日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区若葉一丁目22番1 株式会社オクテック
内

【氏名】 奥村 勝弥

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区築地二丁目11番24号 ジェイエスアー
ル株式会社内

【氏名】 三原 誠

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区築地二丁目11番24号 ジェイエスアー
ル株式会社内

【氏名】 吉岡 瞳彦

【特許出願人】

【識別番号】 000004178

【氏名又は名称】 ジェイエスアール株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 502128800

【氏名又は名称】 株式会社オクテック

【代理人】

【識別番号】 100081994

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴木 俊一郎

【選任した代理人】

【識別番号】 100103218

【弁理士】

【氏名又は名称】 牧村 浩次

【選任した代理人】

【識別番号】 100107043

【弁理士】

【氏名又は名称】 高畠 ちより

【選任した代理人】

【識別番号】 100110917

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴木 亨

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 014535

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9912908

【包括委任状番号】 0206793

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 バイオチップおよびその使用方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 容器本体と、

各セルごとに異種のプローブを担持した粒子を収納する、側壁で仕切られた複数のセルからなるセルユニットとを有し、

各セルの底壁が、前記粒子を遮断し、且つ被検体とこれを溶解または分散する水系媒体とを通過させるフィルターで形成され、

被検体と水系媒体とが前記フィルターを介して全てのセルへ入出可能に構成されていることを特徴とするバイオチップ。

【請求項2】 各セルの側壁の少なくとも一部が、前記粒子を遮断し、且つ被検体と水系媒体とを通過させるフィルターで形成されていることを特徴とする請求項1に記載のバイオチップ。

【請求項3】 容器本体の内部において、セルユニットが当該容器本体と一緒に形成されていることを特徴とする請求項1または2に記載のバイオチップ。

【請求項4】 セルユニットと、容器本体とがそれぞれ独立に形成され、

セルユニットが、容器本体の内部に収納可能に構成されていることを特徴とする請求項1または2に記載のバイオチップ。

【請求項5】 セルユニットと容器本体との間隙で構成される被検体収納室へ、全てのセルが、底壁または側壁を形成するフィルターを介して隣接していることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載のバイオチップ。

【請求項6】 各セル内に、前記の異種のプローブを担持した粒子が収納されていることを特徴とする請求項1～5のいずれかに記載のバイオチップ。

【請求項7】 各セルの底壁を形成するフィルターの細孔が、均一な孔径を有し、且つ、均一な孔間ピッチで形成されていることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載のバイオチップ。

【請求項8】 前記粒子の粒子径と、前記フィルターの細孔の孔径との関係が、
粒子径／孔径=1. 1～2. 5であり、且つ、粒子径<孔間ピッチ<粒子径×2であることを特徴とする請求項7に記載のバイオチップ。

【請求項9】 各セルに収納された前記粒子の数が、当該セルの底壁を形成するフィルターの細孔数の5倍以下であることを特徴とする請求項1～8のいずれかに記載のバイオチップ。

【請求項10】 以下の(1)～(4)の工程を含み、複数の成分からなる被検体を同時に複数の成分に分画分離することを特徴とする被検体の分画分離方法。

(1) 請求項1に記載のバイオチップのセルに、各セルごとに異種のプローブを担持した粒子を収納する工程

(2) バイオチップの容器本体内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのセル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程

(3) 前記溶液の界面の高さを、セル底壁の下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各セル内から除去する工程

(4) 各セルへ、セル開口から分離剤溶液を投入して、担持したプローブと被検体とが反応した前記粒子から被検体を分離して、前記各セルに対応する複数の被検体収納セルを備えた容器へ当該被検体を移動させる工程

【請求項11】 工程(2)において、被検体を含む溶液の界面の高さを、セル底壁の上面から前記粒子の粒子径+10μm以上にして、当該被検体と、全てのセル内の前記粒子とが接触可能な状態とすることを特徴とする請求項10に記載の被検体の分画分離方法。

【請求項12】 工程(2)において、各セル内の前記溶液を攪拌して、他のセル内へ流通させることを特徴とする請求項11に記載の被検体の分画分離方法。

【請求項13】 以下の(1)～(4)の工程を含み、被検体を複数のプローブにより同時検出することを特徴とする、被検体の検出方法。

(1) 請求項1に記載のバイオチップのセルに、各セルごとに異種のプローブを担持した粒子を収納する工程

(2) バイオチップの容器本体内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのセル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程

(3) 前記溶液の界面の高さを、セル底壁の下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各セル内から除去する工

程

(4) 各セルごとに、前記粒子と被検体との反応または相互作用を検出する工程

【請求項14】 工程(2)において、被検体を含む溶液の界面の高さを、セル底壁の上面から前記粒子の粒子径+10μm以上にして、当該被検体と、全てのセル内の前記粒子とが接触可能な状態とすることを特徴とする請求項13に記載の被検体の検出方法。

【請求項15】 工程(2)において、各セル内の前記溶液を攪拌して、他のセル内へ流通させることを特徴とする請求項14に記載の被検体の検出方法。

【請求項16】 工程(4)において、各セルごとに、前記粒子に担持されたプローブと被検体との相互作用に関する状態を計測し、各粒子ごとに得られた相互作用の状態情報に基づき、セル単位での相互作用情報を算出することを特徴とする請求項13～15のいずれかに記載の被検体の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、バイオチップ、これを用いた被検物質の分画分離方法および検出方法に関する。さらに詳しくは、バイオプローブを担持した粒子を収納したバイオチップ、当該プローブ粒子と相互作用する被検物質を試料中から分離分画する方法、および被検物質とバイオプローブとが相互作用する際の被検物質の各種の挙動の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

二本鎖DNAは、例えば加熱により一本鎖DNAとした場合でも、これらの構造が相補的であるため相互に結合するという性質を有し、この性質を利用して、ノーザンハイブリダイゼーション法が確立された。そして、従来、適当な長さの特定の配列を有するDNAを制限酵素などでフラグメント化したもの、あるいは合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして使用し、これらと相補的な配列を有するDNAフラグメントやオリゴヌクレオチド等を検索することが標準的な手

法として行われてきた。

【0003】

しかしながら、ノーザンハイブリダイゼーション法は、操作が煩雑であり、少數の検体を処理する場合であっても、短時間にこれらを処理することができないという問題点があった。このため、ノーザンハイブリダイゼーション法を応用した簡便な処理方法として、スライドグラス等の基板上に上記のようなオリゴヌクレオチド等を高密度に固定化し、短時間で分析を行うことができるDNAチップが開発され、現在、汎用されている。

【0004】

このDNAチップの代表的な例として、スライドグラス等の平面基板上にオリゴヌクレオチドが固定されたものがある。このチップは、基板上に1塩基を固定した後、この塩基と他の塩基とを1塩基ずつ結合させて、20～30塩基程度の長さまで伸張させて作成することができ、光照射下または酸の存在下で所定の塩基配列をもつオリゴヌクレオチドを直接チップ上で合成してDNAチップを製造することができる。

【0005】

あるいは、予め合成しておいた適当な長さのオリゴヌクレオチドを基板上に結合させて作成することができ、この方法では、別途オリゴヌクレオチド合成機などで合成したDNAを粒子担体から分離し、これをスポットターにより所定位置にスポットする、いわゆるブラウン法が用いられる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかし、前者の方法では、塩基配列をチップ上で合成するため、一部の塩基配列で合成ミスが生じると、そのチップ全体が不良品となってしまう。この結果、チップの歩留まりは y^{4np} となる。ここで、 y は1回の塩基合成工程における正合成確率、 n は塩基数、 p はプローブ数である。したがって、プローブ数が増えると歩留まりが幾何級数に低下することになる。

【0007】

一方、後者の方では、DNAのスポット量とスポット位置は、スポットターの

精度などに大きく依存し、良好な再現性を得ることが難しい。

また、目的とする塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを精度良く検出するためには、狭いスペースに効率よく、このオリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチド（以下、「プローブ」ともいう。）を固定する必要がある。このようなプローブを基板上に固定できる数は、個々のプローブの占有面積とDNAチップ自体の大きさから定まり、一定数以上を固定することは物理的に不可能である。そして、現在使用されているDNAチップのような、被検体に浸漬して反応させるスタイルのチップでは、使用可能な被検体溶液の量が非常に少ない場合もあることから、チップ自体は小さい方がよい。

【0008】

しかし、チップの大きさを小さくしていくと、プローブを固定できる面積が小さくなることから、狭いスペースのために検出信号が弱くなり、検出感度が低下する。

こうした点を改良すべく、最近では、三次元ゲル上に上記のようなプローブを固定したチップが製造され、市販されている（例えば、非特許文献1を参照）。これらのチップでは、プローブが三次元ゲル上に三次元的に固定され、プローブ密度が高いために検出信号の強度は高くなるが、ノイズの信号強度も高くなるためにS/N比が上がり難い。ここでノイズの信号強度が上がってしまう要因としては、三次元ゲル上に固定されたプローブと被検体との非特異的反応によって形成された生成物の除去が難しいことが考えられる。

【0009】

一方、中空糸を束ねて、これらの中空糸の内面側壁にプローブを結合させて三次元化プローブを形成し、これによりプローブ密度を向上させたチップも開発されている（特許文献1を参照）。

また、垂直異方性の細孔を有する多孔質アルミナ基板を用い、この垂直な孔の内壁にプローブを固定して三次元構造とすることでプローブ密度を上げ、さらに孔が垂直に空いたフローダウン構造を利用して、被検体とプローブとを反応させた後に未反応物を洗浄除去することが可能なバイオチップも近年開発されている

(特許文献2を参照)。

【0010】

このようにプローブを中空糸の内面側壁あるいは多孔質アルミナの細孔内壁と結合する上記したいずれの方法においても、プローブは固定壁に固定されているために、被検体とプローブとが反応する際には、被検体が固定されたプローブへ近接あるいは接触する必要がある。しかしながら、このプローブの大きさは、反応空間容積と比較すれば極めて微小であり、反応空間のスケールで見れば、プローブは固定壁からわずかに突起として飛び出しているに過ぎず、被検体がプローブに近接あるいは接触する確率は極めて低い。したがって、これらの方法では反応のために長時間の攪拌を必要とする。

【0011】

また、このように三次元構造の内壁にプローブを固定化した場合、孔の深さを深くすると、被検体を光学的に検出する際に光のロスが大きくなってしまう。さらに、プローブが固定された位置により攪拌ムラが生じ、例えば隅側は攪拌されにくく、反応が行われにくいなどの問題がある。

上記のように固定壁へプローブを固定する代わりに、粒子へプローブを担持して、このプローブ担持粒子を含む溶液中で、プローブ担持粒子と被検体とを反応させる方法も行われている。この方法は、プローブ担持粒子が溶液中に三次元的に分散していることと、プローブ担持粒子と被検体とが相互に移動することができることから、反応性が非常に高いというメリットがある。

【0012】

非特許文献2には、被検体である標的核酸と、粒子に担持された核酸プローブとを溶液中でハイブリダイズさせた後、遠心分離して未反応の被検体を除去する方法が記載されており、この方法は現在でも広く使用されている。

しかしながら、このように遠心分離を用いると、分離に時間を要し、また分離性能がそれほど高くないという問題点がある。

【0013】

特許文献3、4には、プローブを担持する粒子として磁性の粒子を使用し、磁石によりこの磁性粒子を固定して、未反応の被検体を洗浄除去する方法が記載さ

れている。この方法も現在広く使用されている。

また、特許文献5には、被検体である標的核酸と、粒子に担持された核酸プローブとを溶液中でハイブリダイズさせた後、濾紙で濾過洗浄を行い、濾紙上に濃縮された粒子由来の信号を測定する方法が記載されており、この方法も広く使用されている。

【0014】

しかしながら、これらの文献に記載された、プローブ担持粒子を使用するいずれの方法においても、1種類の被検体に対して、複数のプローブによる多項目同時検査（Multiplex Assay）あるいは多項目同時分離分画を行うことができない。

また、プローブ担持粒子と反応した被検体を、これらの粒子が溶液中に分散した状態で光学的に検出する場合、一般に、溶液中の粒子を光学的に検出する際には、粒子による光散乱の影響を強く受けるため、粒子あるいは粒子ラベルの発する光強度を効率よく検出することが難しく、検出し得る光強度はこれらの発する正味の光強度から相当に低下したものとなる。

【0015】

一方、プローブ担持粒子を使用して多項目同時検査を行う方法として、複数のプローブを識別する何らかの識別ラベルを付けた粒子を用いる方法が提案されている。

例えば、特許文献8には、粒子を複数の色で識別する方法が記載されており、現在この方法は既に実用化されている。

【0016】

しかしながら、この方法では識別し得る色の種類に限度があり、一定の波長範囲で重ならないで分光できる光は約100種類であり、したがって、約100種類の色、すなわち100種類のプローブの同時検査しかできないといわれている。

この他、特許文献6には、粒子サイズとその形状により粒子を識別する方法が記載されている。また、特許文献7には、粒子を一次元あるいは二次元に配列し、種類の異なるプローブ粒子を区分するために、サイズの異なる微粒子を分離隔

壁として用いる方法が記載されている。

【0017】

上記した各文献に記載された、粒子を識別して多項目同時検査を行ういずれの方法においても、粒子の識別のためにフローサイトメーターによる検出が行われている。しかしながら、この方法では、粒子を細管中に流し、この細管の透明部分からレーザーを照射して粒子をシークエンシャルに識別するために、検出時間が掛かるという問題点がある。また、検出時間を短縮するためには1個の粒子識別に時間が掛けられず、検出精度が低下する可能性がある。さらに、粒子の識別に用いるレーザーと、被検体の検出に用いるレーザーの2本のレーザーを必要とするため、装置コストが上がる。また、フローサイトメーターの細管は高価であり、被検体を替えるごとに細管を取り替えることはコスト的に困難である。このため、被検体を替えるごとに細管を洗浄する必要があり、洗浄を充分に行なうためにはさらに時間を要する。

【0018】

バイオチップには、そのプローブとしてDNAフラグメントまたはオリゴヌクレオチドを固定したDNAチップの他、抗原および抗体等のタンパクあるいはこれらのタンパクと反応する化学物質を固定したプロテインチップ等があるが、上述してきた各問題点は、これらのプロテインチップ等においても同様に存在する。

【0019】

これらのDNAチップ、およびプロテインチップは、基板上に固定する各種のプローブによって、各種感染症等の疾病の罹患状況を確認するための臨床検査；遺伝子多型の検出；テラーメード治療と称される、患者の遺伝子配列に応じた治療医薬の選定；トキシコゲノミックスと称される、医薬品開発のための薬理スクリーニングあるいは化学物質の、毒性スクリーニング；その他の各種スクリーニング等に応用することができる。

【0020】

しかしながら、こうした各種の用途に応用するためには、現在使用されているバイオチップでは検出感度が充分ではない。例えば、病気を極初期で発見するた

めには、病気の極初期の段階において細胞から細胞外に出てくる、極めて微量である病気由来の検体を検出する必要があるが、現状のバイオチップによる検出感度では、この極微量の検体を検出するためには不充分であるといわれており、より高感度のバイオチップが必要とされている。

【0021】

また、患者の病気の状態に関する正確な情報を得て、診断誤差を最小限にするためには、単一のプローブでは不充分であり、複数の異なるプローブによる多項目同時検査が必要である。したがって、高い検出感度で多項目同時検査を行うことができるバイオチップが要望されている。

本発明は、上記した従来技術の問題点を解決するために為されたものであり、その目的は、多項目同時分離分画を行うことができ、高い検出感度で多項目同時検査 (Multiplex Assay) を行うことができるバイオチップ、これを用いた被検体の分画分離方法および検出方法を提供することにある。

【0022】

【特許文献1】

特開2000-181074号公報

【特許文献2】

特表平9-504864号公報 (国際公開第01/12846号公報)

【特許文献3】

特開昭63-27000号公報

【特許文献4】

特許第2975603号公報

【特許文献5】

特開昭63-27000号公報

【特許文献6】

特開平11-243997号公報

【特許文献7】

特開2000-346842号公報

【特許文献8】

米国特許 5 7 3 6 3 3 0 号公報

【非特許文献1】

Analytical Clinica Acta 第444巻 p. 69-78 (2001年)

【非特許文献2】

Nucleic Acid Research 第14巻 p. 5037-5048 (1986年)

【0023】

【課題を解決するための手段】

本発明のバイオチップは、容器本体と、各セルごとに異種のプローブを担持した粒子を収納する、側壁で仕切られた複数のセルからなるセルユニットとを有し、各セルの底壁が、前記粒子を遮断し、且つ被検体とこれを溶解または分散する水系媒体とを通過させるフィルターで形成され、被検体と水系媒体とが前記フィルターを介して全てのセルへ入出可能に構成されていることを特徴とする。

【0024】

また、本発明のバイオチップは、各セルの側壁の少なくとも一部が、前記粒子を遮断し、且つ被検体と水系媒体とを通過させるフィルターで形成されていることを特徴とする。

また、本発明のバイオチップは、容器本体の内部において、セルユニットが当該容器本体と一体に形成されていることを特徴とする。

【0025】

また、本発明のバイオチップは、セルユニットと、容器本体とがそれぞれ独立に形成され、

セルユニットが、容器本体の内部に収納可能に構成されていることを特徴とする。

また、本発明のバイオチップは、セルユニットと容器本体との間隙で構成される被検体収納室へ、全てのセルが、底壁または側壁を形成するフィルターを介して隣接していることを特徴とする。

【0026】

また、本発明のバイオチップは、各セル内に、前記の異種のプローブを担持した粒子が収納されていることを特徴とする。

また、本発明のバイオチップは、各セルの底壁を形成するフィルターの細孔が、均一な孔径を有し、且つ、均一な孔間ピッチで形成されていることを特徴とする。

【0027】

また、本発明のバイオチップは、前記粒子の粒子径と、前記フィルターの細孔の孔径との関係が、粒子径／孔径 = 1. 1 ~ 2. 5 であり、且つ、粒子径 < 孔間ピッチ < 粒子径 × 2 であることを特徴とする。

また、本発明のバイオチップは、各セルに収納された前記粒子の数が、当該セルの底壁を形成するフィルターの細孔数の 5 倍以下であることを特徴とする。

【0028】

本発明の、被検体の分画分離方法は、以下の (1) ~ (4) の工程を含み、複数の成分からなる被検体を同時に複数の成分に分画分離することを特徴とする。

(1) 上記した本発明のバイオチップのセルに、各セルごとに異種のプローブを担持した粒子を収納する工程

(2) バイオチップの容器本体内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのセル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程

(3) 前記溶液の界面の高さを、セル底壁の下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各セル内から除去する工程

(4) 各セルへ、セル開口から分離剤溶液を投入して、担持したプローブと被検体とが反応した前記粒子から被検体を分離して、前記各セルに対応する複数の被検体収納セルを備えた容器へ当該被検体を移動させる工程

また、本発明の、被検体の分画分離方法は、工程 (2) において、被検体を含む溶液の界面の高さを、セル底壁の上面から前記粒子の粒子径 + 10 μm 以上にして、当該被検体と、全てのセル内の前記粒子とが接触可能な状態とすることを特徴とする。

【0029】

また、本発明の、被検体の分画分離方法は、工程（2）において、各セル内の前記溶液を攪拌して、他のセル内へ流通させることを特徴とする。

本発明の、被検体の検出方法は、以下の（1）～（4）の工程を含み、被検体を複数のプローブにより同時検出することを特徴とする。

（1） 請求項1に記載のバイオチップのセルに、各セルごとに異種のプローブを担持した粒子を収納する工程

（2） バイオチップの容器本体内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのセル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程

（3） 前記溶液の界面の高さを、セル底壁の下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各セル内から除去する工程

（4） 各セルごとに、前記粒子と被検体との反応または相互作用を検出する工程

また、本発明の、被検体の検出方法は、工程（2）において、被検体を含む溶液の界面の高さを、セル底壁の上面から前記粒子の粒子径+10μm以上にして、当該被検体と、全てのセル内の前記粒子とが接触可能な状態とすることを特徴とする。

【0030】

また、本発明の、被検体の検出方法は、工程（2）において、各セル内の前記溶液を攪拌して、他のセル内へ流通させることを特徴とする。

また、本発明の、被検体の検出方法は、工程（3）において、各セルごとに、前記粒子に担持されたプローブと被検体との相互作用に関する状態を計測し、各粒子ごとに得られた相互作用の状態情報に基づき、セル単位での相互作用情報を算出することを特徴とする。

【0031】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を、図面を参照して詳細に説明する。

図1および図2は、本発明のバイオチップの実施形態を示した上面図およびA-A'断面図である。

図1および図2に示したように、本発明のバイオチップ10は、容器本体12と、セルユニット14とを有している。

【0032】

セルユニット14は、側壁20で仕切られた複数のセル16、16…からなり、これらのセル16、16…には、担持するプローブの種類が各セル16ごとに異なるプローブ担持粒子が収納される。

セル16の底壁22は、フィルター18で形成されている。このフィルター18は、セル16に収納されたプローブ担持粒子を遮断するとともに、このバイオチップ10を用いて分離、検出等を行う被検体と、これを溶解または分散する水系媒体とを通過させる。

【0033】

容器本体12の内部に導入されたこの被検体と水系媒体は、フィルター18を介して全てのセルへ入出可能に構成されている。すなわち、被検体と水系媒体は、フィルター18を介してセル16と隣接する、セルユニット14と容器本体12との間隙で構成される被検体収納室26を介して、フィルター18から任意のセル16へ入出できるようになっている。

【0034】

あるいは、側壁20も同様にフィルター18で形成されていてもよく、この側壁に形成されたフィルター18を介して、隣接するセル16、16間で被検体と水系媒体を行き来させることも可能である。この場合、底壁22を形成するフィルターと、側壁20を形成するフィルターとは互いに同質のもので連続して形成されていてもよく、それぞれ異質のフィルターで構成して構成した複合フィルターとしてもよい。

【0035】

容器本体12とセルユニット14は、図1（A）、（B）に示したように、両者を同一材料から一体に形成するか、あるいは両者を接着して固定することにより、容器本体12の内部において、セルユニット14と容器本体12とを一体化してもよい。

あるいは、図2（A）、（B）に示したように、バイオチップ10を、それぞ

れ独立した容器本体12とセルユニット14の二体から構成して、セルユニット14が、容器本体12の内部に収納されるようにしてもよい。この場合、容器本体12は各操作時において常に同一である必要は無く、その単位操作に応じて当該容器本体を変更することも可能である。

【0036】

上記のように構成されたバイオチップ10では、各セル16に収納されたプローブ担持粒子は、そのセル位置によりプローブの内容が特定され、複数のプローブをチップ上にコンタミすることなく収納することができる。

また、被検体はプローブ坦持粒子が収納されたセル16、16…間を自由に行き来することができ、チップ10の構造、あるいは被検体溶液の攪拌条件を適宜選択することにより、全てのセル16、16…へ被検体を循環させることができ、被検体と、複数の種類の粒子坦持プローブとの反応の機会が与えられる。

【0037】

本発明の好適な態様では、セルユニット14と容器本体12との間隙で構成される被検体収納室26へ、全てのセル16、16…が、底壁22または側壁20を形成するフィルター18を介して直接に隣接している。

この被検体収納室26は、例えば図1（A）、（B）のようにセルユニット14の底部下面と容器本体12の底部上面との間隙で構成される他、図2（A）、（B）のように、それぞれ独立したセルユニット14と容器本体12との間隙で構成される。

【0038】

このように構成することによって、被検体溶液を共通に収納する被検体収納室26から、攪拌と必要に応じて加減圧を行うことにより、1層のフィルター18を通過して、それぞれ異種のプローブを担持した粒子を収納する複数のセル16、16…に並列的に到達して、並列的に反応が行われる。

さらに、特定のセル16内で反応しなかった未反応の被検体は、さらに攪拌あるいは加減圧により他のセル16内に到達して反応が試みられる。このように各セル16、16…間で逐次的に未反応の被検体とプローブ担持粒子との反応が試みられる。

【0039】

そして、本態様では被検体収納室26と各セル16、16…とが1層のみのフィルター18を介して隣接しているため、圧力損失は最低限で済み、また、被検体の被検体収納室26への到達と、各セル16におけるプローブ担持粒子との反応が並列で行われるために反応時間を最短にすることが可能となる。

さらに、フィルター18の細孔と、その深さを適當な条件に設定することで、圧力損失を極めて低減することが可能であり、被検体溶液は、あたかもフィルター18が無い一つのスペースを移動するかのように、プローブ担持粒子を収納した全てのセル16、16…と、被検体の共通部屋を構成する被検体収納室26との間を自由に移動することが可能となる。

【0040】

さらに、図4に示したように、容器本体12底部の端側に、セルユニット12の底面と当接するスペーサ部28を設け、被検体収納室26の高さを低くすることで、被検体の量を少なくすることができる。この高さは、具体的には、 $30\mu\text{m} \sim 3\text{mm}$ が好ましく、より好ましくは $100\mu\text{m} \sim 1\text{mm}$ である。この高さが $30\mu\text{m}$ 未満である場合、界面抵抗のために被検体が移動しづらく、この高さが 3mm を超えて、被検体量が増えるだけで積極的な意味が無い。

【0041】

以下、本発明のバイオチップ10を構成する、セルユニット、容器本体およびプローブ担持粒子について説明する。

〈セルユニット〉

セルユニット14の寸法は、チップ10の用途、プローブの種類あるいは被検体の量により特定され、その大きさは特に限定されない。

【0042】

チップ10を分離分画に用いる場合、各セル16における底壁22のフィルター18の細孔数が、そのセル内に収納されたプローブ担持粒子の数の $1/5 \sim 1000$ 倍となるようにセルユニット14の寸法を設定することが望ましく、より好ましくはこの比率が $1 \sim 500$ 倍となるように、さらに好ましくは $3 \sim 100$ 倍となるように設定することが望ましい。

【0043】

フィルター18の細孔数が、粒子数の1/5未満であると、粒子が孔の上に堆積して目詰まりを起こし、フィルター18のろ過圧力が高くなることがある。また、フィルター18の細孔数が、粒子数の1000倍を超えると、粒子と被検体との接触効率が低下するため分離精製効率が低下し、さらにセルユニット14の底面が大きくなるために被検体量が増えてしまう。

【0044】

チップ10を被検体の検出に用いる場合、各セル16における底壁22のフィルター18の細孔数が、そのセル内に収納されたプローブ担持粒子の数の2~1000倍となるように、セルユニット14の寸法を設定することが望ましく、より好ましくはこの比率が5~500倍となるように、さらに好ましくは10~100倍となるように設定することが望ましい。

【0045】

フィルター18の細孔数が、粒子数の2倍未満であると、粒子が孔の上に堆積して目詰まりを起こし、フィルター18のろ過圧力が高くなることがあり、また被検体同士の凝集の可能性が高くなる。フィルター18の細孔数が、粒子数の1000倍を超えると、粒子と被検体との接触効率が低下するため反応時間が増大し、さらにセルユニット14の底面が大きくなるために被検体量が増えてしまう。

【0046】

フィルター18は、細孔を有する各種の形態のもので形成することができる。フィルター18の具体的な態様としては、金型によるプレス、織布、不織布、マイクロポアフィルター(MF)、超マイクロポアフィルター(UF)、限外濾過膜、フィルムにレーザーもしくは中性子線で穿孔して形成したフィルター、樹脂もしくは金属薄膜に傷をつけて張力により孔を拡大したもの、基材をフォトエッチングにより穿孔したもの、樹脂成型によるもの、樹脂の連続発泡体、融点とガラス転移温度の間の温度で樹脂粒子を結合させた焼結樹脂、ロックポリマーの自己集合、溶媒可溶性粒子を混合したフィルムから溶媒にて粒子を溶媒溶解除去したもの、低熱分解性粒子を混合したフィルムから熱焼成にて粒子を除去したもの

の、などを挙げることができる。

【0047】

フィルター18を形成する材料としては、有機材料および無機材料のいずれも使用可能であるが、粒子あるいは被検体を含む溶液が水系の溶液であることから、その粘性抵抗を考慮すると親水性の材料が好ましく、且つ、充分な機械的強度を有するものが好ましい。

フィルター18を形成する有機材料としては、具体的には、ポリカーボネート、ポリアミド樹脂、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリアミド、ポリメチルペンテン、ポリアリレート、ポリサルホン、ポリエーテルサルホン、ポリイミド、トリアセチルセルロース、セルロースアセテート樹脂、硝酸セルロース樹脂、エポキシ樹脂等を挙げることができる。また、これらの材料表面の親水性を高めるために、当該材料の親水性を付与したい表面部分に、プラズマ処理、コロナ処理あるいはイオン処理等を施して、ヒドロキシル基やカルボキシル基などを形成してもよい。あるいはメッキなどにより表面に親水性の金属あるいは金属酸化物を形成することも可能である。

【0048】

フィルター18を形成する無機材料としては、具体的には、金、ニッケル、アルミニウム、チタン、シリコーン等の金属；シリカ、アルミナ、チタニア等の金属酸化物；SiN等の金属窒化物；ソーダガラス、ホウ珪酸ガラス、バイレックス（R）、石英ガラス等のガラスなどを挙げることができる。

このようなフィルター18が各セルの壁面に形成されたセルユニット14は、例えば、①～④の方法で作製することができる。

【0049】

① 図3（A）に示したように、フィルター18をコルゲート状にして、その凸頂部32と凹頂部34とを、側壁20を構成する適当なフィルムに接着して各セル16、16…を形成する方法

② 図3（B）に示したように、金属あるいは樹脂製のフィルターを、プレス金型を用いて、所定の間隔に凹部を有する形状に成型してこの凹部をセル16

、16…とする方法

③ 図3 (C) に示したように、一定のサイズの水溶性樹脂粒子あるいはフィラメントを混入した基材樹脂を成型して、側壁20に仕切られた箱状の凹部を作製した後、基材樹脂に混入している水溶性樹脂粒子あるいはフィラメントを溶解することにより、側壁20および底壁22に細孔を形成してフィルター18とする方法

④ 図3 (D) に示したように、セル16、16…の底壁22に、レーザー、プレス、フォトエッチング等で貫通孔を穿設してフィルター18とする方法

⑤ 図3 (E) に示したように、底壁22の無い、側壁20で形成されたものを作成し、その底部にフィルター18を接着する方法

⑥ 図3 (F) に示したように、金属ガラス、あるいは樹脂等をフォトエッチングする方法

本発明の好適な態様では、底壁22を形成するフィルター18の細孔が、実質的に均一な孔径と均一な孔間ピッチを有している。

【0050】

ここで、「実質的に均一な孔径」とは、孔径の誤差がC V (Coefficient of Variation) 値で10%以下であることを意味する。このようにC V 値を10%以下とすることにより、粒子と孔径の寸法差を僅少とすることが可能となる。

例えば、従来から使用されているメンブレンフィルター等の孔径には10倍程度のばらつきがあり、例えば0.2 μm 孔径のフィルターを使用する場合では、確実に濾過できる粒子径は例えば5 μm 程度となる。これと比較して、本態様では、フィルター18の細孔の孔径は非常に均一であるため、例えばこれらの従来のフィルター法で使用していたものと同一の粒子径の粒子を本態様で使用する場合で比較すると、フィルター18の孔径をより大きくすることが可能となり、フィルター18の濾過性を向上するとともに、濾過圧力を低減することが可能となる。

【0051】

また、本発明のさらに好適な態様では、フィルター18の細孔がストレートに貫通して形成されている。これにより、フィルター18の圧力損失はさらに低減

され、被検体溶液が全てのセル16、16…および被検体収納室26の間をさらに自由に移動し易くなる。

ここで、ストレートとは孔が途中で分岐することなく空いていることを意味する。また、このストレートな細孔の、一方の開口の中心からのフィルター18面への垂線と、他方の開口の中心からの当該垂線がずれていても、圧力損失という点ではそれほど遜色がないため、このような細孔であってもよい。

【0052】

また、当該フィルターはフィルムに孔が空いている形状以外に溝状の形状でも構わない。また、フィルターの補強の意味で当該フィルターの裏面にさらに細孔の大きいあるいはネット状のフィルターをあてがうことも可能である。

このように、実質的に均一な孔径を有し、実質的に均一な孔間ピッチで形成された細孔を有するフィルター18は、例えば以下に示すような複数の方法で作成することが可能である。

【0053】

第一の方法は、フォトリソグラフィーによる方法である。すなわち、所定の有機あるいは無機のフィルムにレジストを塗布し、フォトエッチングすることにより所定の孔を空けてフィルター18を形成する。

この場合、所定の機械的強度を有する膜厚と所定の孔径を確保するためには、高アスペクトのエッチングが必要であるが、異方性エッチングによりこれを達成することが可能である。

【0054】

第二の方法は、エキスパンドメタルによる方法である。例えば、厚さ $30\ \mu\text{m}$ のステンレス箔に、金型にて千鳥状に切れ目を入れ、これを押し広げてひし形状の貫通孔を形成することができる。この方法によれば、ひし形孔の最大距離が $30\ \mu\text{m}$ であり、開口率が60%程度のフィルターを得ることが可能である。

次いで、得られたエキスパンドメタルフィルターを、さらに凸金型で処理して所定の凹面を作成してセル16、16…を形成する。あるいは、別途に樹脂もしくは金属にて、ハニカムあるいは角型などの上下が貫通したセル部屋群を作成し、この底面と上記のエキスパンドメタルフィルターを接着してセル16、16

…を形成する。この接着は、予めセル部屋群の底面にUV硬化性樹脂を塗布して、フィルター上にセル部屋群を置いた後にUV照射硬化して行うことができる。

【0055】

第三の方法は、樹脂にて上下が貫通したセル部屋群と底面フィルターとを一体で成型する方法である。

このような方法によって、均一な孔径をもつフィルターを形成することができ、プローブ担持粒子の粒子径とフィルター細孔の孔径の差を最小差にすることが可能となる。これにより、上記したように、一定の粒子を使用する場合に従来のメンブレンフィルターに比して大きな孔径のフィルターを使用することが可能となる。また、ストレート孔のフィルターであることと相俟って、濾過性を上げることができ、濾過圧力を低限することが可能となる。

【0056】

また、孔径がストレートとなるために、孔内部の表面積が少なくなり、被検体の孔内壁への付着を減らすことができる。

また、後述するように、セル内から溶液を除去して被検体粒子を溶液から頭出しして被検体の分離分画を行う場合、あるいは検出を行う場合に、粒子を一定間隔で孔上に並べることが出来る。そのため分離分画にて粒子を複数層積層する場合は、粒子の間隔を適当に並べかつ積層することが可能となり、濾過性を制御することが可能である。

【0057】

また検出の場合のように粒子を単層でフィルター上で並べる場合も孔上に一定化区画で粒子が並べられるために粒子の重なりを避け単層配列が可能となる。

本発明のさらに好適な態様では、プローブ担持粒子の粒子径と、フィルター18の細孔の孔径が、粒子径／孔径 = 1. 1 ~ 2. 5 であり、且つ、粒子径 < 孔間ピッチ < 粒子径 × 2 である関係を有している。

【0058】

粒子径／孔径が 1. 1 未満である場合、粒子が細孔に入り込み、細孔から粒子が脱離できない確率が高くなる。粒子径／孔径が 2. 5 を超える場合、粒子を含

む溶液をフィルターを介して濾過し、粒子をフィルター上に残した際に、粒子が孔上に位置せず、ランダムに、あるいは粒子同士が重なり合ってフィルター上に配列される確率が高くなる。

【0059】

粒子が細孔に入り込み離脱することをさらに防止し、且つ細孔上に細密充填配列する確率をより高くするためには、上記の関係が、粒子径／孔径 = 1.15 ~ 2.0 であることがより好ましく、さらに好ましくは粒子径／孔径 = 1.2 ~ 1.6 である。

また、孔間ピッチが粒子径以下である場合、粒子を含む溶液をフィルターを介して濾過し、粒子をフィルター上に残した際に、粒子が孔上に位置せず、ランダムに、あるいは粒子同士が重なり合ってフィルター上に配列される確率が高くなる。

【0060】

また孔間ピッチが粒子径の2倍以上である場合、粒子を含む溶液をフィルターを介して濾過する際に、細孔上に配列される粒子以外に、細孔間に配列される粒子が増えるため、ランダムに、あるいは粒子同士が重なり合ってフィルター上に配列される確率が高くなる。

本発明のバイオチップ10では、前述したように、各セル16の底壁22を形成するフィルター18の細孔数と、そのセル内に収納されたプローブ担持粒子の数との比率が所定の関係を満足することが好ましい。すなわち、分離分画の場合では、粒子数がこの細孔数の5倍以下とすることが好ましく、検出の場合では、粒子数がこの細孔数の1/2倍以下とすることが好ましい。

【0061】

チップ10を用いて分離分画を行う場合において、粒子数がこのセル区画内のフィルター18の細孔数の5倍を超えると、粒子が孔の上に堆積して目詰まりを起こし、フィルター18のろ過圧力が高くなることがある。

また、チップ10を用いて検出を行う場合において、粒子数がこのセル区画内のフィルター18の細孔数の1/2倍を超える場合、粒子が孔の上に堆積して目詰まりを起こし、フィルター18のろ過圧力が高くなることがあり、また被検体

同士の凝集の可能性が高くなる。また、各粒子が細孔上に配列されるのみならず、複層に重なり合って配列するために、後述するように被検体の検出において粒子の数をカウントする際に、粒子の数あるいは粒子の反応状態を正確にカウントあるいは検出することの障害となる。

【0062】

各セル16内へ収納するプローブ担持粒子の絶対数は、次の方法で制御することができる。すなわち、粒子溶液の投入時にパーティクルカウンター、フローサイトメーターあるいはCCDカメラなどで個々の粒子を実際にカウントしながら投入するか、あるいは、予め粒子溶液の粒子濃度を測定しておき、当該溶液内の粒子濃度と粒子の比重から粒子数を計算して、この結果から逆算した粒子溶液量をスポット等で投入することで、近似的粒子数をセル部屋に投入することができる。また、複数回に分けて所定数の粒子をスポットし、スポットした粒子数をその都度カウントして不足量を算出し、不足量がゼロ近似になるまでスポットを行う方法も可能である。

【0063】

ここで、粒子数は、ある程度の近似的な同一性があればよいが、その誤差範囲はCV値で10%以内が望ましい。例えば、均一径ポリスチレンラテックス粒子スタデックス（JSR社製）を用いた実験では、粒子数のパーティクルカウンターでのCV値は、粒子径0.344ミクロンから5.392ミクロンの範囲では、3.75%の範囲に収まっていることが確認されており（JSR TECHNICAL REVIEW NO99/92 p13～p16）、CV値を10%以内にすることは充分に可能である。

【0064】

また、セルごとに投入されるプローブ担持粒子の絶対数は、分離精製用途の場合には、被検体量によって決定されるものであり、前述した各セル内のフィルターの細孔数との間で所定関係を保っていれば、その絶対数は特に限定されない。一方、検出用途の場合には、セルあたりの粒子の絶対数は少なくとも5個あればよく、好ましくは500個以下であり、より好ましくは20～300個、さらに好ましくは50～100個である。粒子数が5個未満である場合、粒子数が統計

的な母集団として不足し、粒子数が500個を超える場合、粒子が凝集する確率が高くなり、また粒子数が統計的な母集団として過剰であり、さらに粒子を個別にカウントしながら投入、検出する方法の場合は粒子の投入、検出に必要以上の時間を要する。

＜容器本体＞

容器本体12の材質は特に限定されず、有機材料および無機材料のいずれも使用することができる。

【0065】

有機材料としては、具体的には、ポリエチレン、ポリエチレン酢酸ビニル樹脂、ポリエチレンビニル樹脂、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリブタジエン、ポリアクリロニトリル樹脂、ポリメチルメタアクリレート樹脂、ABS樹脂（アクリロニトリルとステレンの共重合体）、ABS樹脂（アクリロニトリル、ブタジエンおよびステレンの共重合体）、AAS樹脂（アクリロニトリル、アクリル酸エステルおよびステレンの共重合体）、ポリカーボネート、ポリアミド樹脂、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、脂肪族ポリエステル、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、脂肪族ポリアミド、脂環式ポリアミド、シクロオレフィン、ポリメチルペンテン、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリアリレート、ポリサルホン、ポリエーテルサルホン、ポリイミド、トリアセチルセルロース、セルロースアセテート樹脂、硝酸セルロース樹脂、エポキシ樹脂、ポリテトラフルオロエチレン、フッ化エチレンポリプロピレンコポリマー、テトラフルオロエチレンパーフロオロアルコキシビニルエーテルコポリマー、ポリクロロトリフルオロエチレン、エチレンテトラフルオロエチレンコポリマー、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化ビニル、シリコーン樹脂などが挙げられる。

【0066】

中でも、被検体の付着が少なく、容器本体への付着により被検体量を減少させないことから、フッ素系の材料が好ましい。このようなフッ素系の材料としては、具体的には、ポリテトラフルオロエチレン、フッ化エチレンポリプロピレンコポリマー、テトラフルオロエチレンパーフロオロアルコキシビニルエーテルコポリマー、ポリクロロトリフルオロエチレン、エチレンテトラフルオロエチレンコポリマー、ポリエチレン、エチレンテトラフルオロエチレン、エチレンテトラフルオロエチレンコ

ポリマー、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化ビニルなどが挙げられる。

【0067】

また、上記した各種の有機材料には、その表面にフッ素系の材料をコーティングしてもよい。

これらの有機材料の成形方法としては、例えば、射出成形、プレス成形、射出圧縮成形、射出プレス成形、圧縮成形、トランスファー成形、切削成型等が可能であるがこれらに限定されるものではない。

【0068】

無機材料としては、具体的には、金、銀、ニッケル、銅、鉄、アルミニウム、チタン、シリコーン等の金属；シリカ、アルミナ、チタニア等の金属酸化物；SiN等の金属窒化物；ソーダーガラス、ホウ珪酸ガラス、パイレックス(R)、石英ガラス等のガラスなどが挙げられる。

これらの無機材料は、プレス成型、板のエッティング、樹脂もしくは金属容器への表面塗布などに例示される、成型あるいは表面処理加工などの各種方法により容器形状とすることができます。

＜プローブ坦持粒子＞

プローブを坦持する粒子としては、フィルター18の細孔径よりも大きな径をもつ粒子であれば特に限定されず、有機粒子、無機粒子、有機無機粒子、相転移ゲルなどのいずれも使用可能である。

【0069】

有機粒子としては、具体的には、ブタジエン系、スチレン系、ジビニルベンゼン系、アクリロニトリル系、アクリレート系、メタクリレート系、アクリルアミド系、ベンゾグアナミン系およびフッ素系等のモノマーを、単独あるいは2種以上を組み合わせて用いたモノマー原料から、乳化重合あるいはサスペンション重合により得られた再分散系粒子を使用することができる。あるいは多孔質の均一孔を持つプレートから樹脂を押し出して粒子を作成する膜乳化などによる方法も可能である。これらの粒子は必要に応じて分級機にて粒子径を揃えることも可能である。

【0070】

また、重合時にあるいは重合後にフェライト等の磁性体を添加して得られたもの、粒子をフェライトメッキしたもの、あるいはセルロース、デンプン、アガロース、ガラクトース等の天然物架橋ゲル、アクリルアミド等の合成架橋ゲルも使用することができる。また、蛋白発現バキュロウイルス、遺伝子組み替えレトロウイルスおよび各種の細胞そのものを、担体とプローブを兼ねたものとして使用することもできる。

【0071】

粒子の表面には、例えば、アミノ基、カルボキシル基、カルボジイミド基、エポキシ基、トシリ基、N—サクシイミド基、マレイミド基、チオール基、スルフィド基、ヒドロキシル基、トリメトキシシリル基、ニトリル三酢酸基、ベンゾスルホアミド基、ポリエチレンイミン基などの各種官能基を持たせることが好ましい。

【0072】

スチレン系の粒子については、例えば特開昭57-168163号公報に記載の方法により得ることが可能である。

また、磁性粒子は、例えば特開平11-176622号公報に記載の方法により得ることが可能である。

無機系の粒子としては、金属酸化物粒子、金属硫化物粒子、金属粒子を使用することができる。

【0073】

金属酸化物粒子として最も好ましいのは、シリカ粒子であり、市販の各種シリカ粒子を使用することができる。

また、市販されている各粒子が使用可能であり、例えば、イムテックス（商品名：J S R）、M C I ゲル（商品名：三菱化学）、トヨパール（商品名：東ソー）、ダイソーゲル（商品名：ダイソー）、サンスフェアー（商品名：旭硝子）、P 5 0 0（商品名：東レ）、トレパール（商品名：東レ）、テクポリマー（商品名：積水化成品工業）、M P, M R シリーズ（商品名：総研化学）、ベルパール（商品名：鐘紡）、エポスター（商品名：日本触媒工業）、セルロースパウダー（チッソ、旭化成）、セファセル（商品名：アマーシャムフォルマシア社）、セ

ファロース（商品名：アマーシャムフォルマシア社）などが使用可能である。

【0074】

また、粒子表面を、アミノ基、カルボキシル基、カルボジイミド基、エポキシ基、トシリ基、N-サクシイミド基、マレイミド基、チオール基、スルフィド基、ヒドロキシル基、トリメトキシシリル基、ニトリル三酢酸基、ベンゾスルホアミド基、ポリエチレンイミン基等の各種官能基、あるいは γ -グリシドオキシプロピルトリメトキシシランなどにより表面修飾して、プローブ結合サイトとすることができる。

【0075】

また、これらの表面修飾に際して、粒子担持プローブと被検体との反応の際の立体障害を低下させるために、炭素数10～100のアルキレン基の両端に官能基が結合した構造の化合物、例えば、エチレングリコールジグリシジルエーテル誘導体、N-k-マレイミドウンデカニック酸、メルカプトプロピルトリメトキシシラン、カリックスアレン誘導体、液晶をスペーサーとして使用することができる。また、アミノ基、カルボキシル基、チオール基などで修飾されたオリゴヌクレオチドもスペーサーあるいはスペーサー兼結合サイトとして使用可能である。

【0076】

プローブを担持する粒子として、有機粒子を使用する場合、その粒子径は、0.01 μ m～1mmが好ましく、より好ましくは0.2 μ m～0.5mmであり、さらに好ましくは0.4 μ m～0.3mmである。粒子径が0.01 μ m未満である場合、これに対応するフィルター18が高価となり、また目詰まりし易くなる。

【0077】

粒子径が0.5 μ m以上であって、多孔質または中空状の粒子でない場合には、重量により沈降するか、あるいはプラウン運動などによる粒子の動きが鈍くなり、被検体との反応性が低下する。但し、粒子径が0.5 μ m以上である場合は、粒子を多孔質または中空状とすることで、粒子の沈降や反応性低下を避けることが可能であり、この場合には粒子径の上限は特に限定されないが、粒子径をあ

まり大きくする積極的な意味は無い。

【0078】

プローブ担持粒子の粒子径およびフィルター18の細孔径は、チップ10の用途により使い分けることが可能である。特に被検体が血液であり、これを直接チップ10内に投入する場合は、プローブ担持粒子の粒子径およびフィルター18の細孔径は、10μm以上が好ましく、被検体が血清であり、これを直接チップ10内に投入する場合は、プローブ担持粒子の粒子径およびフィルター18の細孔径は、1μm以上が好ましい。

【0079】

プローブ担持粒子を各セル16、16…内へ収納する方法としては、粒子に予め各セル16に対応した各種のプローブを別途固定化しておき、これをスポットター等で対応するセル内に投入する方法が挙げられる。あるいは、プローブ結合サイトを表面に有する粒子をスポットター等で各セル16、16…に投入し、次いで、所定のセルに対応した、種類の異なるプローブをスポットターなどで対応するセル16に投入する方法を用いることも可能である。

【0080】

前者の方法では、粒子にプローブを結合する方法として、市販されている各社の合成機を使用することができ、例えば、オリゴヌクレオチドの合成機、ペフチドの合成機、糖鎖合成機、コンビナトリアルケミストリーによる各種低分子化合物合成機などを使用することができる。固相法では反応と分離のために担体としてシリカビーズやポリスチレンジビニルベンゼン粒子が使用されており、これらの粒子とチップ10に用いる粒子担体を兼用することで、合成機で合成したプローブ担持粒子をそのままチップ10にスポットして収納することができる。これらの合成機、特にオリゴヌクレオチドの合成機は汎用されており、現在では、例えば夕方に合成機をセットすれば、翌朝にはオリゴフルオロトチドを固定化した粒子を作成することもできるようになり、これをスポットするだけで任意のヌクレオチドをもつオーダーメードチップを極めて短時間に作成することができる。特に、現在、S N P S研究には、遺伝子配列を変えた膨大な種類のプローブが必要であり、これらの研究には非常に効果的である。

【0081】

粒子に担持するプローブとしては、例えば、オリゴヌクレオチド、ヌクレオチド数5～100の一本鎖核酸、分子量500～100万のタンパク質、脂質、糖鎖、細胞、タンパク質発現細胞、アプタマー、ウィルス、酵素、分子量50～100万の、薬理活性を有するリード化合物、あるいは特定の生理活性作用を持つか、これを持つ可能性のある化学物質などを使用することができる。

【0082】

このうち、分子量50～100万のタンパク質としては、具体的には、合成ペプチド、膜タンパク質、酵素、輸送蛋白、サイトカイン、リンフォカイン、IgAおよびIgEなどの抗体、各種抗原、あるいはルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン、クリーン蛍光タンパク質等の生物発光機能を有するものなどが挙げられる。

【0083】

脂質としては、具体的には、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトーマンノシド、ウルシオール、各種のガングリオシドなどが挙げられる。

アプタマーは、タンパク質、酵素、色素、アミノ酸、ヌクレオチド、成長因子、遺伝子発現調節因子、細胞接着分子、生物個体などと結合能力のある機能性核酸であり、具体的には、トランビンアプタマー、エラスターーゼアプタマー、活性化プロテインC、C型肝炎ウィルスのNS3プロテアーゼアプタマーなどが挙げられる。

【0084】

ウィルスとしては、具体的には、バキュロウィルス内にタンパク質を発現させたものが挙げられる。

分子量50～100万の、低分子リード化合物としては、具体的には、基質、補酵素、調節因子、レクチン、ホルモン、神経伝達物質、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、アプタマー等のリガンド、フェニルピペリジン誘導体、スルホンアミド／スルホン酸誘導体、ステロイド、プロスタグランデイン誘導体などの医薬候補物質が挙げられる。

【0085】

以下、本発明の被検体の分画分離方法について、工程順に説明する。

最初に、各セル16ごとに、それぞれ異種のプローブを担持した粒子を収納する。

次いで、図4 (A)、(B)に示したように、上述した本発明のバイオチップ10の容器本体12内に、被検体25を含む溶液を投入して、被検体25と、全てのセル16内のプローブ担持粒子24とが接触可能な状態とする。

【0086】

この際、被検体25を含む溶液の界面の高さを、底壁22の上面からプローブ担持粒子24の粒子径+10μm以上にして、被検体25と、全てのセル内の粒子24とを接触させる。この界面高さは、より好ましくは底壁22の上面からプローブ担持粒子24の粒子径×100+10μm以上、且つ底壁22の上面からプローブ担持粒子24の粒子径×100,000以下であり、さらに好ましくは底壁22の上面からプローブ担持粒子24の粒子径×500+10μm以上、且つ底壁22の上面からプローブ担持粒子24の粒子径×10,000以下である。

【0087】

界面高さが、底壁22の上面からプローブ担持粒子24の粒子径+10μm未満である場合、プローブ担持粒子24は、フィルター18面の物理的、化学的な影響を受けるため、あるいはスペースそのものが少ないために、ブラウン運動などの、粒子の運動が制約され、結果として被検体25との反応性が阻害される。

また、界面高さが、底壁22の上面からプローブ担持粒子24の粒子径×100,000以上である場合、多量の被検体溶液量が必要であるとともに、反応性がこれ以上は向上しないので、特にこれ以上とする必要はない。

【0088】

また、この界面の高さは、上記の条件を満たすとともに、側壁20の高さを超えないことが必要である。但し、プローブ担持粒子24の粒子径または比重を大きくし、プローブ担持粒子24が溶液内でセル16内の底面から大きく浮上せず、側壁20の高さ以下ののみを浮遊する条件をつくり出した場合には、溶液界面は側壁20以上の高さにしてもよい。

【0089】

このように所定の界面高さとなるまで被検体25を含む溶液を投入する方法としては、例えば以下の方法が挙げられる。

第一の方法は、図1に示したバイオチップ10のように、予め容器本体12の底面と、フィルター18との距離を一定としたチップを用いて、セル開口部17から被検体溶液を投入して、フィルター18よりも上側まで溶液界面を上昇させて、所定の界面高さまで到達させるか、あるいは被検体収納室26において、容器本体12の低壁もしくは側壁に形成した被検体25の導入口42から被検体溶液を投入する方法である。被検体溶液をセル開口部17から投入する場合には、スポット等で各セル16ごとに均等量を投入することが好ましい。また、被検体溶液を導入孔42を通して投入する場合は、当該導入口42から加圧して被検体溶液を送り込むか、あるいは被検体収納室26側を減圧にして被検体溶液を送り込む方法のいずれの方法も可能である。

【0090】

第二の方法は、図2に示したバイオチップ10のように、セルユニット14と容器本体12が独立したものを用いて、予め容器本体12に被検体溶液を入れておき、そこにセルユニット14を浸漬して、フィルター18を介して各セル16内に被検体溶液を進入させる方法である。この際に、フィルター18の圧力損失がある場合は、セルユニット14と容器本体12とが相互に接する部分をシールしてフィルター18に加圧あるいは減圧が掛かるようにすることで、被検体溶液をフィルター18を通過させて各セル16内に導くことができる。

【0091】

次いで、被検体25と、全てのセル16内のプローブ担持粒子24とを接触させる（図4（B））。セル16内の被検体溶液を入れ替える方法としては、例えば図1（B）および図2（B）のように側壁20がフィルター18で形成されて隣接する各セルがフィルター18で仕切られている場合は、被検体溶液を攪拌することで、各セル16内の溶液を入れ替えることができる。この攪拌方法としては、攪拌羽根の付いた攪拌機、音波あるいは超音波による振動、空気や常磁性体の移動による攪拌など、既存の方法による攪拌が可能である。これらのうちで特

に好ましいのは音波あるいは超音波による振動であり、容器本体12またはセルユニット14を振動させるか、あるいは振動子をチップ10内の被検体溶液中に入れる方法などいずれも可能である。この場合、振動の適用周波数は、プローブや被検体の種類により適宜調節することができ、100Hz～1GHzが使用可能であり、好ましくは1kHz～10MHzであり、より好ましくは5kHz～100kHzである。この範囲の周波数では、インピーダンスが低く、対象物の損傷を最低限に抑えることができる。適用周波数が100Hz未満では、攪拌能力が低く、適用周波数が1GHzを超えると、被検体あるいはプローブを損傷する可能性がある。また、図2のように容器本体12とセルユニット14が独立している場合には、フィルターセル部屋を回転するか、あるいは上下移動させて容器本体12とセルユニット14とを相対移動させて各セル16内の溶液を入れ替えることができる。セル16同士がフィルター18ではない側壁で仕切られている場合は、底壁22のフィルター18から溶液を被検体収納室26に導き、次にフィルター18を通して他のセル16内に溶液を導くことにより溶液の入れ替えをすることができる。

【0092】

また、入れ替えの方法としては、上述した溶液界面の上昇手法と、フィルター後述の下降手法とを組合せて行なうこともできる。

次いで、図5 (A) に示したように、被検体溶液の界面の高さを、セル16の底壁22の下面未満となるまで低下させて、プローブ担持粒子25に担持したプローブと反応していない被検体を除去する。ここで、溶液界面の高さをフィルター18の底面以下にする方法はとしては、被検体溶液を、底壁22のフィルター18を介してポンプあるいは加減圧等により排出口44から容器本体12外へ、あるいは被検体収納室26へ移す方法が挙げられる。また、容器本体12とセルユニット14とが独立している場合には、容器本体12とセルユニット14とを相対移動させてフィルター18を上下させる方法、あるいはセルユニット14を、バイオチップ10と隣接する容器、あるいは独立した別の容器に移す方法が挙げられる。

【0093】

さらに、本操作の前後において、必要に応じて、各種のクリーニング液や各種の緩衝液などの薬液を投入しても良い。これらの投入方法は被検体の投入方法と同様に行うことができる。

次いで、図6に示したように、各セル16へ、上部の開口17から分離剤溶液を投入して、被検体と反応したプローブ担持粒子から被検体を分離して、各セル16に対応する複数の被検体収納セル52を備えた容器54へ当該被検体を移動させる。

【0094】

分離剤溶液の投入方法としては、スポット等を用いて、セル開口17から、各セル16ごとに個別にあるいは各セル16へ一度に投入することができる。

被検体を分離した溶液を移動させる容器54は、各セル16とそれぞれ対応した複数の被検体収納セル52、52…を設けた容器54であれば特に限定されない。例えば、セル16、16…と略同一のサイズを有する被検体収納セル52、52…を設けた容器54を、セルユニット14の直下に位置させて、分離剤溶液をセル開口17から投入して被検体溶液を当該セル16内のプローブ担持粒子から分離し、その直下に位置する被検体収納セル52へ収容することができる。

【0095】

上記の方法により分離分画された被検体は、次の反応工程の出発物質あるいは検出のための予備精製体として使用することもできるが、質量分析計、ラマン分析計、表面プラズモン分析計、X線分析計、電気化学検出装置、水晶発信子マイクロバランス検出装置などの各装置に、分離分画された被検体を投入して、いわゆるラベル化剤を必要としない分析方法により、被検体の内容を解析することも可能である。

【0096】

これらの手段により解析するに際して、温度を変えるか、あるいは複数回の経時検出を行うことにより、いわゆるカイネティック (Kinetic) 解析を行うことが可能である。さらに、単に被検体の内容やプローブと反応したリガンドが存在するかどうかを解析するのみならず、セル16内の各粒子ごとに内容を解

析することにより、被検体に含まれるリガンドの濃度あるいは量を求めることができる。

【0097】

上記の方法による分離分画の対象となる被検体としては、各種の培養液、組織、菌、ウイルス、細胞、リンパ球、脂質、糖鎖、核酸、血液、血清、血球、ヒト／マウスサイトカイン、セリン／スレオニン、キナーゼ、分子量50～100万のタンパク質である合成ペプチド、膜タンパク質、酵素、シグナル伝達蛋白、輸送蛋白、リン酸化タンパク質等の各種タンパク質、サイトカイン、リンフォカイン、IgAおよびIgE等の抗体、各種抗原、転写因子、分子量50～100万の低分子リード化合物である基質、補酵素、調節因子、レクチン、ホルモン、神経伝達物質、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、アプタマー等のリガンド、各種の医薬候補物質、生理活性を有するか、あるいは生理活性を有する可能性がある各種の化学物質などを挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

【0098】

以下、本発明の被検体の検出方法について、工程順に説明する。

最初に、各セル16ごとに、それぞれ異種のプローブを担持した粒子を収納する。

次いで、バイオチップ10の容器本体12内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、各セル16内のプローブ担持粒子とを接触させる（図4（A）（B））。

【0099】

次いで、被検体溶液の界面の高さを、セル16の底壁22の下面以下となるまで低下させて、プローブ担持粒子25に担持したプローブと反応していない被検体を除去する（図5（A））。

これらの工程は、前述した被検体の分離分画方法での操作に準じて行われる。

なお、未反応の被検体を除去する工程において、図5（B）に示したように洗浄液を導入して粒子の洗浄を行い、必要に応じて洗浄液の導入、攪拌、排出を繰り返して、プローブ担持粒子から未反応の被検体を除去することができる。

【0100】

次いで、図7に示したように、各セル16ごとに、プローブ担持粒子と被検体との反応または相互作用を検出する。

このように、被検体溶液の界面の高さを、底壁22の下面未満となるまで低下させた状態で検出を行うことにより、従来のように溶液中でプローブ担持粒子と被検体の反応を検出する場合と異なり、粒子の光散乱の影響やブラウン運動の影響を排除して、粒子に担持されたプローブと被検体との相互作用あるいは反応の状況を、静置した状態で直接見ることが可能となり、検出感度の向上を図ることができる。

【0101】

被検体の検出方法としては、通常行われている各種の方法が適用可能であり、例えば、ラジオアイソトープ検出、蛍光検出、化学発光検出、酵素発光検出、ラマン検出、X線検出等が挙げられるがこれらに限定されない。

これらの中で、光学的な検出方法を用いる場合では、一般に溶液中での粒子あるいは粒子ラベル化剤が発する光は、粒子由来の散乱を強く受けて検出光強度が低下するのに対して、本方法では散乱の影響を受けないで粒子を検出することができる。

【0102】

また、これらの中で、ラジオアイソトープ検出、蛍光検出、化学発光検出および酵素発光検出に際して、蛍光体などのラベル化剤、サンドイッチ抗体などの第二プローブ、発色酵素や化学発色剤、化学発光剤、金属あるいは半導体による発光増強剤ナノ粒子などを添加する場合においては、これらの添加は被検体の投入と同様の方法で行うことができる。

【0103】

上記した検出方法により検出を行うに際して、温度を変えるか、あるいは複数回の経時検出を行うことにより、いわゆるカイネティック (Kinetic) 解析を行うことが可能である。さらに、単に被検体の内容やプローブと反応したりガンドが存在するかどうかを解析するのみならず、セル16内の各粒子ごとに内容を解析することにより、被検体に含まれるリガンドの濃度あるいは量を求める

ことができる。

【0104】

また、蛍光発光、化学発光検出、酵素発光検出などのいわゆる光学的な検出においては、図7に示したように、チップ10の上面から検出光62を検出するか、あるいはチップ10の底面を通過する検出光64を検出することが可能である。底面を通過する検出光64を検出する場合には、容器本体12の底部を透明にするか、あるいは容器本体12からセルユニット14を取り出して、底壁22の下面から検出光を検出する方法のいずれも可能である。

【0105】

また、蛍光検出で励起光を使用する場合には、チップ10の、検出光と同じ面側から励起光を照射する方法と、反対側の面から照射する方法のいずれも可能である。この場合も、光がチップ10の底面を通過する場合は、容器本体12の底部を透明にするか、あるいは容器本体12からセルユニット14を取り出して、底壁22の下面から検出光を検出する方法のいずれも可能である。

【0106】

本発明の好適な態様では、上記の検出工程において、各セル16ごとに、粒子に担持されたプローブと被検体との相互作用に関する状態を計測し、各粒子ごとに得られた相互作用の状態情報に基づきセル単位での相互作用情報を算出する。

この方法では、まず、各セル16に収納されているプローブ担持粒子ごとに、プローブと被検体との相互作用に関する情報を計測する。この計測を行う手段としては、上記に記載した各種の方法が使用可能である。例えば、蛍光検出の場合は、同一セル内に配列した各粒子に検出のためのUV光あるいは可視光などの励起光を照射して、その結果得られる検出光などの信号をCCDカメラなどで検出する。この方法を粒子ごとに個別に行ない、さらにこの検出操作を他のセル16内の粒子についても同様に逐次行う。次にこれらの得られたデータを各セル16ごとに累積処理して、セル16内の粒子数Nの各データについて統計的な標準化処理を行なう。また必要に応じてすでに存在する各種のデータベースのデータとの比較参照を行い、当該データの修正処理あるいは判定処理を行うことが可能である。

【0107】

この方法により、例えば従来のバイオチップにおけるセル単位での光学的な検出方法のように、1つのセルが発する蛍光強度、蛍光スペクトルを測定する方法に比して、検出光の重複が無く、母数Nである表面積を増やせるために強いシグナル強度を得ることができる。

また、温度を変化させるか、あるいは複数回の経時検出を行う、いわゆるカINETIック (Kinetic) 解析において、セル内粒子ごとに、あるいは粒子の検出パターンを経時的にトレースすることにより、母数Nが多く信頼性の高い解析データーを得ることが可能となる。

【0108】

本発明のバイオチップには、そのプローブとしてDNAフラグメントまたはオリゴヌクレオチドを粒子へ担持したDNAチップの他、抗原および抗体等のタンパクあるいはこれらのタンパクと反応する化学物質を粒子へ担持したプロテインチップ、糖鎖を粒子へ担持した糖鎖チップ、細胞を粒子へ担持した細胞チップ等も含まれる。

【0109】

これらのDNAチップ、プロテインチップ、糖鎖チップおよび細胞チップは、担体上に上に固定する各種のプローブによって、遺伝子機能解析；遺伝子発現解析；機能プロテオミクスあるいは構造プロテオミクス；機能セローム、構造セローム、疾病解析、各種感染症等の疾病的罹患状況を確認するための臨床検査；遺伝子多型の検出；テラーメード医療あるいはケモセラピーと称される患者の遺伝子配列に応じた治療医薬の選定；核酸、タンパク質、細胞、あるいは糖鎖と化学物質の相互作用研究、オーファン受容体リガンド探索；トキシコゲノミクスと称される、医薬品開発のための薬理スクリーニングあるいは化学物質の安全性および毒性のスクリーニング；その他の各種スクリーニング等に応用することができる。また、特定の被検体と特定のプローブの組み合わせにより、免疫アッセイ、タンパク質-DNA、タンパク質-タンパク質等の相互作用アッセイ、蛋白、糖鎖、細胞-リガンドアッセイ、リセプタ-リガンドアッセイ、キナーゼ等の酵素アッセイなどの各種アッセイ系を組むことができる。

【0110】**【発明の効果】**

以上説明した、本発明のバイオチップおよび被検体の分画分離方法によれば、多項目同時分離分画を行うことができる。

また、本発明のバイオチップおよび被検体の検出方法によれば、高い検出感度で多項目同時検査（Multiplex Assay）を行うことができる。

【図面の簡単な説明】**【図1】**

図1は、本発明のバイオチップの一実施形態を示した上面図およびA-A'断面図である。

【図2】

図2は、本発明のバイオチップの他の実施形態を示した上面図およびA-A'断面図である。

【図3】

図3は、セルユニットを作製する方法を説明する図である。

【図4】

図4は、本発明の、被検体の分離分画方法および検出方法の一工程を説明する、チップ断面図である。

【図5】

図5は、本発明の、被検体の分離分画方法および検出方法の一工程を説明する、チップ断面図である。

【図6】

図6は、本発明の、被検体の分離分画方法の一工程を説明する、チップ断面図である。

【図7】

図7は、本発明の、被検体の検出方法の一工程を説明する、チップ断面図である。

【符号の説明】

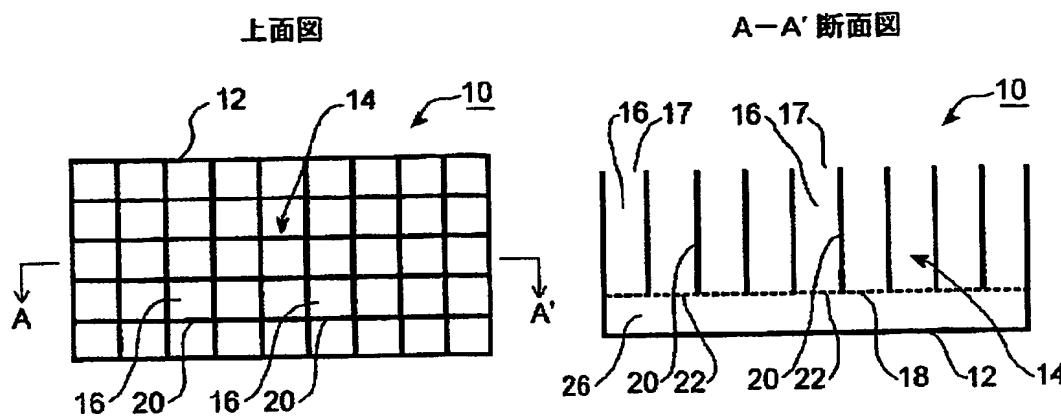
10 バイオチップ

- 1 2 容器本体
- 1 4 セルユニット
- 1 6 セル
- 1 7 セル開口
- 1 8 フィルター
- 2 0 側壁
- 2 2 底壁
- 2 4 プローブ担持粒子
- 2 5 被検体
- 2 6 被検体収納室
- 3 2 凸頂部
- 3 4 凹頂部
- 4 2 導入孔
- 4 4 排出孔
- 5 2 被検体収納セル
- 5 4 容器
- 6 2 検出光
- 6 4 検出光

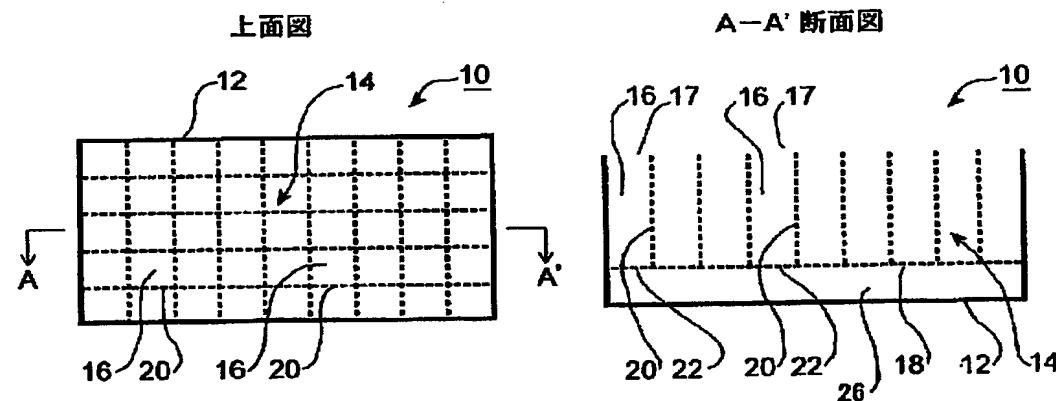
【書類名】 図面

【図1】

(A)

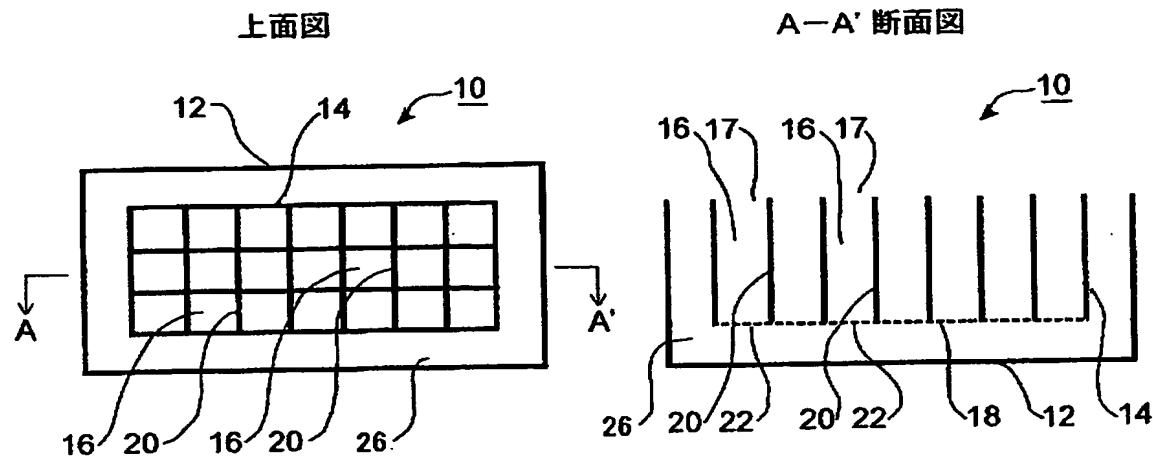


(B)

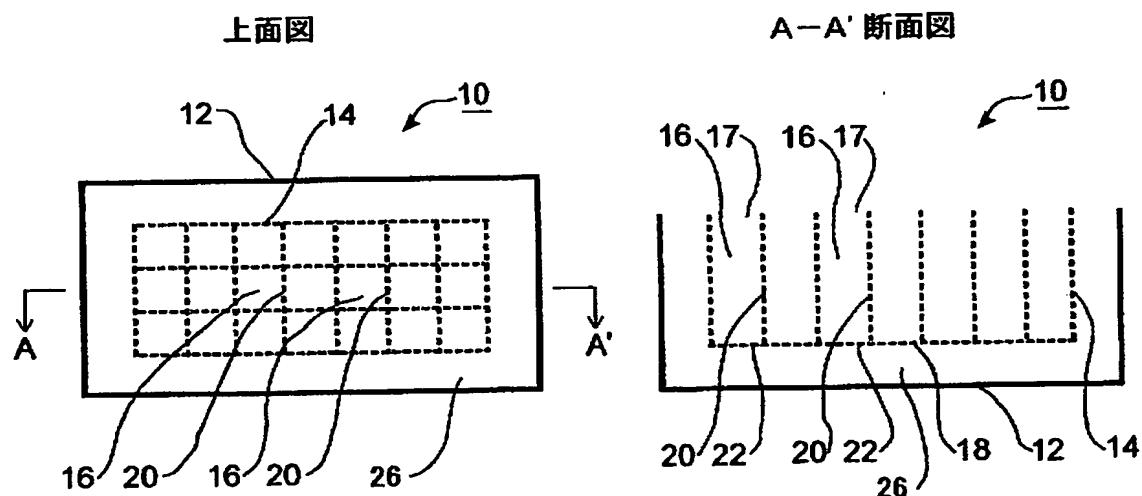


【図2】

(A)

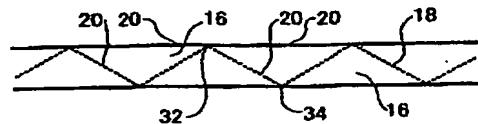


(B)

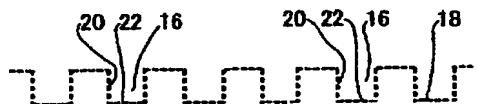


【図3】

(A)



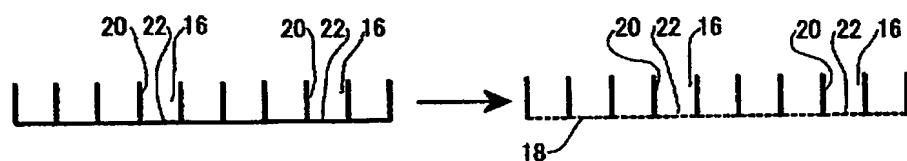
(B)



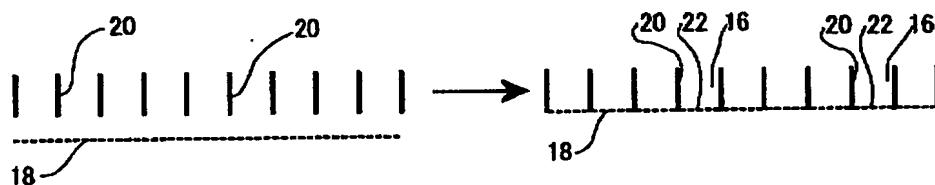
(C)



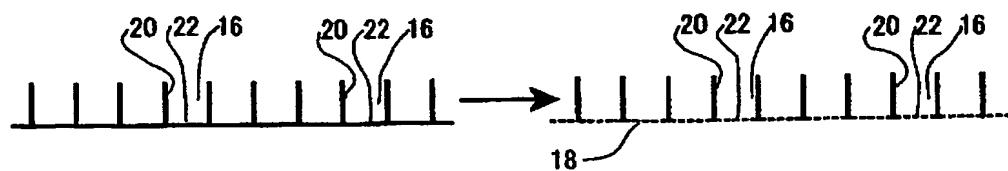
(D)



(E)

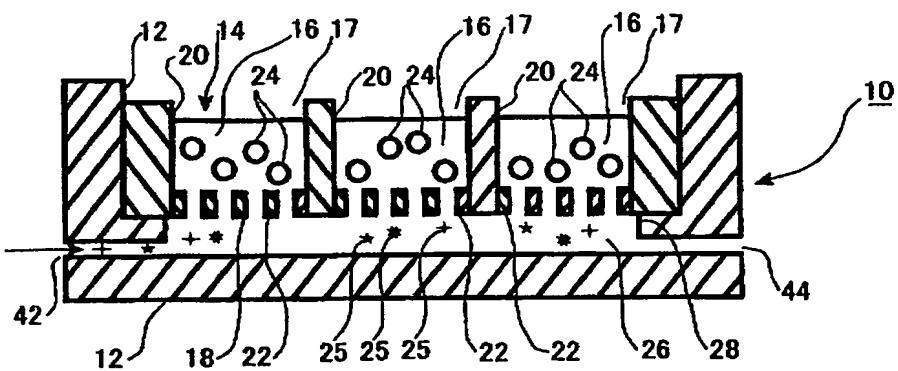


(F)

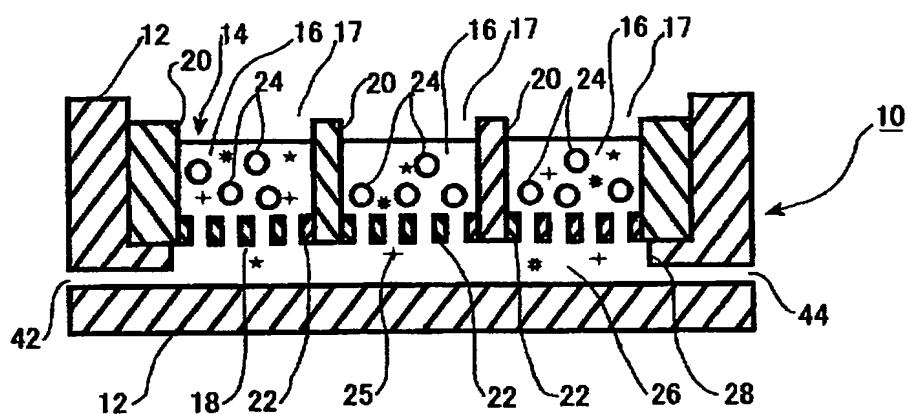


【図4】

(A)

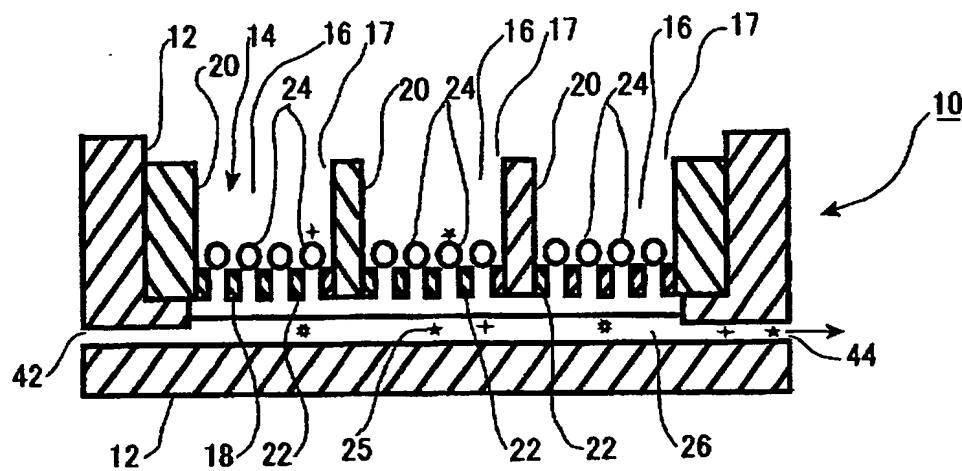


(B)

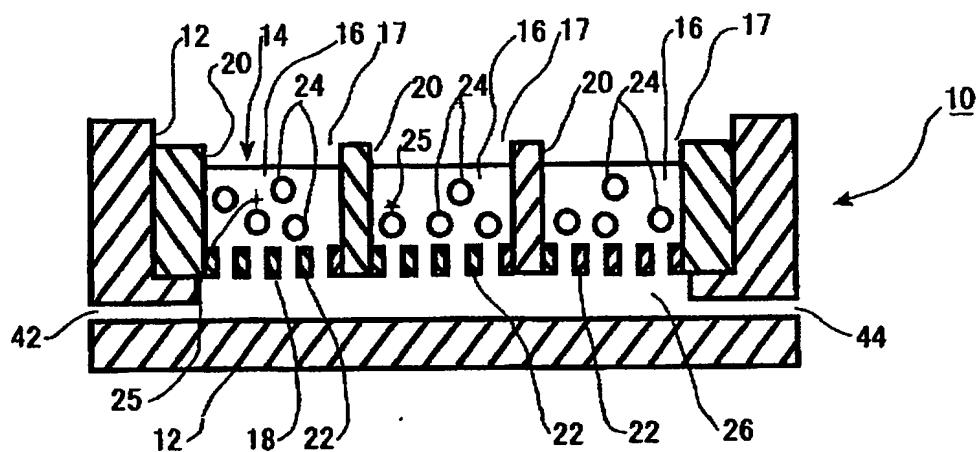


【図5】

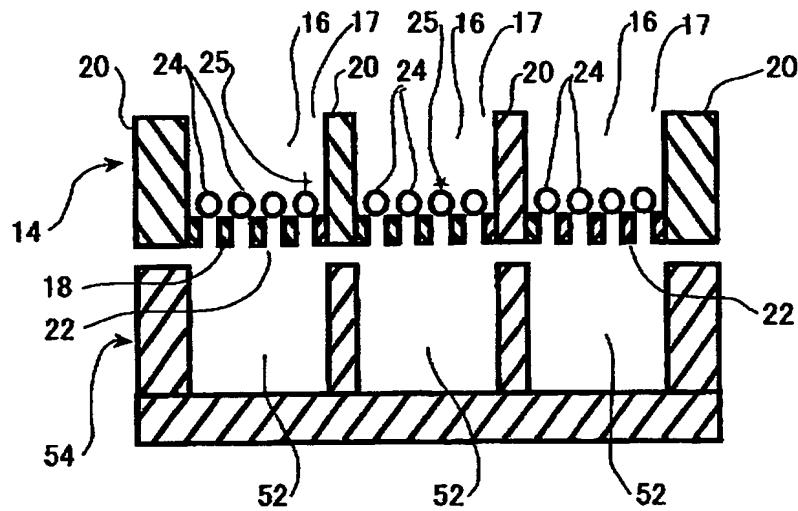
(A)



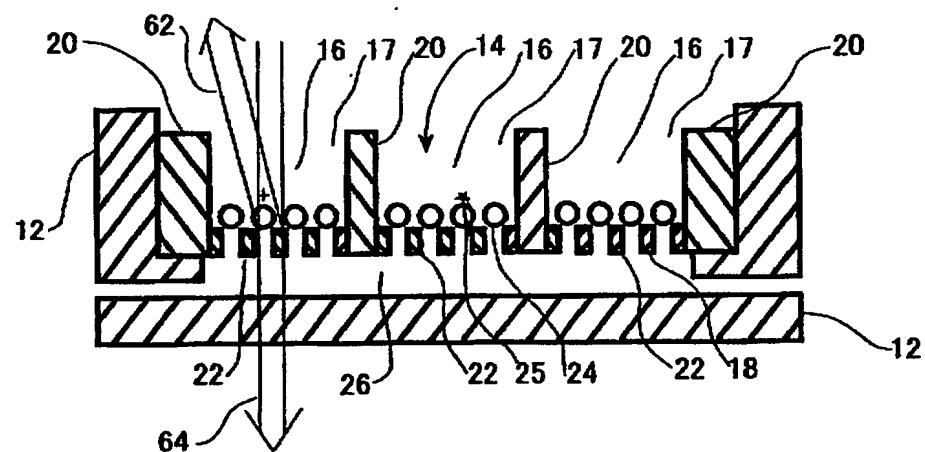
(B)



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 多項目同時分離分画を行うことができ、高い検出感度で多項目同時検査 (Multiplex Assay) を行うことができるバイオチップ、これを用いた被検体の分画分離方法および検出方法を提供する。

【解決手段】 本発明のバイオチップ10は、容器本体12と、各セル16ごとに異種のプローブを担持した粒子を収納する、側壁20で仕切られた複数のセル16、16…からなるセルユニット14とを有している。各セル16の底壁22は、前記粒子を遮断し、且つ被検体とこれを溶解または分散する水系媒体とを通過させるフィルター18で形成され、被検体と水系媒体とがこのフィルター18を介して全てのセル16へ入出可能に構成されている。

【選択図】 図1

特願 2003-122514

出願人履歴情報

識別番号 [000004178]

1. 変更年月日 1997年12月10日

[変更理由] 名称変更

住 所 東京都中央区築地2丁目11番24号
氏 名 ジェイエスアール株式会社

2. 変更年月日 2003年 5月 6日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区築地五丁目6番10号
氏 名 ジェイエスアール株式会社

3. 変更年月日 2003年 9月 1日

[変更理由] 名称変更

住 所 東京都中央区築地五丁目6番10号
氏 名 J S R 株式会社

特願 2003-122514

出願人履歴情報

識別番号 [502128800]

1. 変更年月日 2002年 5月 8日

[変更理由] 名称変更

住所 東京都新宿区若葉一丁目22番1
氏名 株式会社オクテック